

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE *Tocoyena hispidula*Elcilene A. de Sousa^a, Amauri Porto A. Rosa^a, Rodolfo Ritchelle L. dos Santos^b, Ingredy L. dos Santos^b, Valéria C. de Sousa^b, Fernando Aécio de A. Carvalho^b, Gerardo M. Vieira Júnior^a e Mariana H. Chaves^{a,*}^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil^bDepartamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil

Recebido em 15/09/2018; aceito em 07/11/2018; publicado na web em 28/11/2018

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTI-LEISHMANIA ACTIVITY FROM *Tocoyena hispidula*. Phytochemical investigation of the CHCl₃ fraction from EtOH extract of *Tocoyena hispidula* (Rubiaceae) stem resulted in the isolation and identification of D-(+)-mannitol, lupenone, 3-*O*-acetyloleanolic acid, lapachol, dimethyl chelidonate, morindolide and four mixtures (*M1-M4*): *M1* (palmitate, margarate, linoleate, oleate e stearate of the multiflorenyl, lupeyl, sitosteryl and stigmasteryl), *M2* (lupeol, taraxerol, germanicol, β-amyrin and *E*-fitol), *M3* (campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ²²-stigmastenol, sitosterol and sitostanol) and *M4* (7-ketositosterol and 7-ketostigmasterol). Structural identification of the compounds was performed by analysis ¹H and ¹³C NMR spectra and by GC-MS. Extract, fractions, dimethyl chelidonate and morindolide inhibited the growth of *Leishmania major* promastigotes, being the CHCl₃ (IC₅₀ = 26.25 μg mL⁻¹) and EtOAc (IC₅₀ = 29.77 μg mL⁻¹) fractions the more active.

Keywords: chemical composition; *Tocoyena hispidula*; Rubiaceae; anti-*Leishmania*.

INTRODUÇÃO

Rubiaceae é considerada, entre as Angiospermas, a quarta maior família com 650 gêneros e 13.000 espécies.¹ É caracterizada como uma das mais importantes da flora brasileira, com 126 gêneros e 1.412 espécies.^{2,3} É constituída pelas subfamílias Rubioideae, Ixoroideae e Cinchonoideae, as quais possuem como marcadores quimiotaxonômicos antraquinonas, iridoides e alcaloides indólicos, respectivamente. Plantas da família Rubiaceae são também conhecidas por acumularem triterpenoides, saponinas, diterpenoides, esteroides, cumarinas, flavonoides, lignanas, derivados fenólicos e taninos, sendo os triterpenoides amplamente distribuídos em todas as subfamílias.⁴

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas em plantas da família Rubiaceae tais como, anti-inflamatória, analgésica, antiviral, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, anticâncer, anti-helmíntica, antidiabética, antimalárica, hepatoprotetora e antileishmania.^{5,6}

O gênero *Tocoyena* (Rubiaceae) é típico do Cerrado, ocorre na região neotropical, sendo constituído por 30 espécies de hábito arbustivo ou árvores de pequeno porte. No Brasil há registro de 12 espécies, sendo cinco endêmicas, distribuídas em todas as regiões brasileiras.⁷ Esse gênero pertence à subfamília Ixoroideae, tribo Gardenieae-Gardenineae.^{1,8} Somente quatro espécies de *Tocoyena* possuem estudo químico (*T. formosa*, *T. bullata*, *T. brasiliensis* e *T. sellowiana*, sinônimo *T. selleana*), para as quais são relatadas a presença de iridoides, flavonoides, esteroides, cumarinas, derivados fenólicos, triterpenoides e saponinas triterpênicas.⁸⁻¹⁰ Algumas atividades biológicas têm sido relatadas, como anti-inflamatória, antinociceptiva, antifúngica, estimulante em útero de ratas, antioxidante e gastroprotetora para *T. formosa* e capacidade de diminuição da perda óssea em ratos com periodontite para *T. sellowiana*.^{9,11}

Tocoyena hispidula Standl é conhecida popularmente por flor-do-cerrado/angelca e jenipapinho, sendo encontrada nas regiões Norte (Pará) e Nordeste (Maranhão e Piauí) do Brasil na forma de arbustos ou subarbustos. Tradicionalmente suas raízes são utilizadas

no combate a dor de barriga e inflamação do útero,¹² entretanto, não há registros de estudo químico e biológico sobre esta espécie.

O presente trabalho relata o isolamento e identificação estrutural de constituintes químicos da fração CHCl₃ do extrato etanólico do caule de *T. hispidula*, bem como a avaliação do seu potencial antileishmania.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros Varian INOVA-modelo 400 (LAUREMN/UFPI), operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C) e Bruker Ascend-modelo 600 operando a 600 MHz (¹H) e 150 MHz (¹³C). Foram utilizados CDCl₃ ou DMSO-*d*₆ como solventes e TMS como referência interna. O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi registrado em espectrômetro PerkinElmer, modelo Spectrum 100FT-IR, com faixa de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹. O ponto de fusão foi obtido em equipamento da Microquímica Ind. e Com. Ltda, modelo MQAPF-301, com taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹. A rotação específica foi obtida em polarímetro Automático Digital da Jasco-Modelo P2000 (Fonte: Hg, λ=546 nm).

A análise dos esteroides e dos ésteres metílicos por CG-EM foi realizada em cromatógrafo GCMS-QP2010 (Shimadzu), equipado com coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,250 μm), fase estacionária difenildimetilpolissiloxano (5% de difenil e 95% de dimetilpolissiloxano), usando modo split (100:1) e espectrômetro de massas operando com ionização por elétrons (EI 70 eV) com faixa de massas *m/z* 45 a 700 Da, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min⁻¹. As condições de operação da análise cromatográfica dos esteroides foram: temperatura inicial do forno de 100 °C por 2 minutos, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 300 °C permanecendo por 10 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C, da interface 290 °C e da fonte 270 °C. Para os ésteres metílicos foi utilizada a seguinte programação: temperatura inicial do forno de 70 °C por 2 minutos, com taxa de aquecimento de 6 °C min⁻¹ até 310 °C, permanecendo por 10 minutos. A temperatura do injetor

*e-mail: mariana@ufpi.edu.br

foi de 300 °C, da interface 310 °C e da fonte 260 °C. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca Wiley229.

As placas cromatográficas foram preparadas utilizando uma suspensão de gel de sílica 60 da Macherey-Nagel em água destilada e as revelações das cromatoplasmas foram feitas por nebulização com solução de $Ce(SO_4)_2$. Os solventes e reagentes utilizados na preparação dos extratos e fracionamentos foram todos de pureza analítica (P.A.) obtidos da Synth. Nas separações por cromatografia em coluna foram empregados, gel de sílica 0,060-0,200 mm da Macherey-Nagel e Sephadex LH-20 da Aldrich.

Material vegetal

O caule de *Tocoyena hispidula* Standl foi coletado na fazenda Lourdes (S 04° 51' 32,4" W 42° 03' 42,9", altitude: 154 m), no município de Jatobá do Piauí-PI, em 31 de maio de 2015. O material vegetal foi identificado pela botânica Dra. Ruth Raquel Soares de Farias e, uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da UFPI com o número TEPB 30.572.

Isolamento dos constituintes químicos

O caule seco e moído (1,4 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (95%). O material obtido foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, fornecendo 48 g (3,5%) de extrato EtOH. Uma alíquota de 41 g do extrato foi solubilizada em MeOH, ocorrendo a formação de um precipitado, identificado como o composto **1** (4,5 g; 9,4%). A parte solúvel em MeOH do extrato (36,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna filtrante de gel de sílica, utilizando hexano, $CHCl_3$, AcOEt e MeOH como eluentes. A fração $CHCl_3$ (2,8 g) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 82 frações e reunidas em 16 grupos após análise por CCDC. O grupo CC9 (340,7 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando hexano/ CH_2Cl_2 (1:4) e cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt 98:2, fornecendo a subfração CC9-7-2 (161,2 mg) e o composto **2** (14,3 mg).

Uma alíquota de 50 mg da subfração CC9-7-2 (*M1*) foi submetida à reação de hidrólise alcalina,¹³ fornecendo, após extração com éter etílico, as fases etérea (**FE**; 25,2 mg) e aquosa (**FA**). A fase etérea (**FE**) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica utilizando hexano/AcOEt 95:5, resultando nas frações FE-21 (2,7 mg) e FE-35 (10,4 mg), identificadas como as misturas de **3+4** e **5+6**, respectivamente. A fase aquosa (**FA**) foi acidificada com H_2SO_4 a 30% (pH=4), extraída com éter etílico e metilada com diazometano,¹³ resultando em 10 mg da mistura dos ésteres metílicos dos ácidos palmítico (**a**: 16:0, 33,72%), margárico (**b**: 17:0, 2,50%), linoleico (**c**: 18:2, $\Delta^{9,12}$, 22,11%), oleico (**d**: 18:1, Δ^9 , 29,90%) e esteárico (**e**: 18:0, 8,52%), identificados após análise por CG-EM (Figuras 12S-17S).

Os grupos CC13 (143,9 mg), CC15 (167,5 mg) e CC24 (321,0 mg) foram aplicados em colunas cromatográficas de Sephadex LH-20, utilizando hexano/ CH_2Cl_2 (1:4). Os grupos CC13 e CC15 forneceram o composto **18** (44 mg) e a mistura *M2* (**4+7+8+9+11**; 17,7 mg), respectivamente, enquanto CC24 resultou na mistura *M3* (**5+6+12+13+14+15**; 115,0 mg) e no composto **10** (25,9 mg). O grupo CC50 (98,0 mg) também foi submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando hexano/ CH_2Cl_2 (1:4), seguido de filtração em gel de sílica com $CHCl_3$, conduzindo à mistura *M4* (**16+17**; 5,4 mg) e ao composto **19** (5,7 mg). O grupo CC72 (100,7 mg), depois de submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando hexano/ CH_2Cl_2 (1:4) forneceu o composto **20** (46 mg).

Chelidonato de metila (**19**). Sólido amorfo laranja. PF: >200 °C (decomposição). RMN de 1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, em $CDCl_3$): ver Tabela 1.

Avaliação da atividade antileishmania

As formas promastigotas de *Leishmania major* em fase logarítmica de crescimento foram semeadas em placas de cultivo celular com 96 poços (1 x 10^6 leishmania por poço), contendo meio Schneider's suplementado. O extrato EtOH, frações $CHCl_3$, AcOEt e MeOH e os compostos **19** e **20** foram adicionados aos poços em diluições seriadas de 800 a 6,25 $\mu g mL^{-1}$. As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica (BOD) à temperatura de 26 °C e, após 48 h, os parasitas foram corados com resazurina (1 mmol L^{-1}) e feita a leitura em espectrofotômetro para obtenção da densidade ótica a 550 nm. O controle positivo consistiu de 2 $\mu g mL^{-1}$ de anfotericina B diluída em meio Schneider's a 0,2% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade das leishmanias.¹⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato EtOH do caule de *T. hispidula* após suspensão em MeOH formou um precipitado identificado como D-(+)-manitol (**1**).¹⁵ O fracionamento cromatográfico do sobrenadante do extrato EtOH forneceu as frações hexânica (50 mg; 0,15%), $CHCl_3$ (2,8 g; 7,70%), AcOEt (3,6 g; 9,90%) e MeOH (26,6 g; 72,90%). A fração $CHCl_3$, depois de submetida a procedimentos cromatográficos clássicos, resultou no isolamento e identificação da lupenona (**2**),¹⁶ ácido acetiloleanólico (**10**),¹⁷ lapachol (**18**),¹⁸ chelidonato de metila (**19**), morindólídeo (**20**)¹⁹ e quatro misturas (*M1-M4*) de isoprenoides. A mistura *M1* é constituída por triterpenoides e esteroides esterificados com ácidos graxos, entre os quais, o palmitato, margarato, linoleato, oleato e estearato de multiflorenila (**3a-3e**), lupeila (**4a-4e**), sitosterila (**5a-5e**) e estigmasterila (**6a-6e**).^{20,21} A mistura *M2* é composta pelos triterpenoides pentacíclicos lupeol (**4**), taraxerol (**7**), germanicol (**8**), β -amirina (**9**)²⁰ e o diterpenoide *E*-fitol (**11**).²² A mistura *M3* (Figura 20S) é formada pelos esteroides 3β -OH sitosterol (**5**, 47,31%), estigmasterol (**6**, 25,15%), campesterol (**12**, 17,96%), campestanol (**13**, 1,17%), Δ^{22} -stigmastenol (**14**, 2,44%), e sitostanol (**15**, 3,76%)²¹ e a mistura *M4* contém 7-cetositosterol (**16**) e 7-cetoestigmasterol (**17**).²³ As estruturas dos compostos **1-11** e **16-20** foram identificadas pela análise dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura. Os esteroides **12-15** e os ésteres metílicos dos ácidos graxos (**a-e**) foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca Wiley229. As estruturas dos compostos identificados são mostradas na Figura 1.

Não foram encontrados na literatura os dados de RMN para o composto **19**. Seu espectro de RMN de 1H (Figura 33S) apresentou somente dois simpletos em δ 5,85 (H-3/3') e 3,82 (H-5/5') com integração para um e três hidrogênios, respectivamente, sendo este último característico de grupo metoxila. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 34S) mostrou cinco sinais, sugerindo uma estrutura simétrica. Dois sinais em δ 187,0 (C-4) e 176,8 (C-1/1') são de carbonilas, um em δ 157,5 (C-2/2') é de carbono sp^2 não hydrogenado ligado a oxigênio, um em δ 107,6 (C-3/3') de carbono metínico sp^2 e um em δ 56,2 (C-5/5') referente a metoxila. A análise do mapa de contornos gHMBC (Tabela 1 e Figura 36S) mostrou correlações de H-3/3' (δ 5,85) com C-4 (δ 187,0), C-2/2' (δ 157,5) e C-1/1' (δ 176,8) e de H-5/5' (δ 3,82) com C-1/1' (δ 176,8) e C-2/2' (δ 157,5). A análise dos dados de RMN permitiram identificar o chelidonato de metila (**19**). Este composto é o éster metílico do ácido chelidônico, uma γ -pirona já relatada na família Rubiaceae.^{4,24} O composto **19** possui atividade

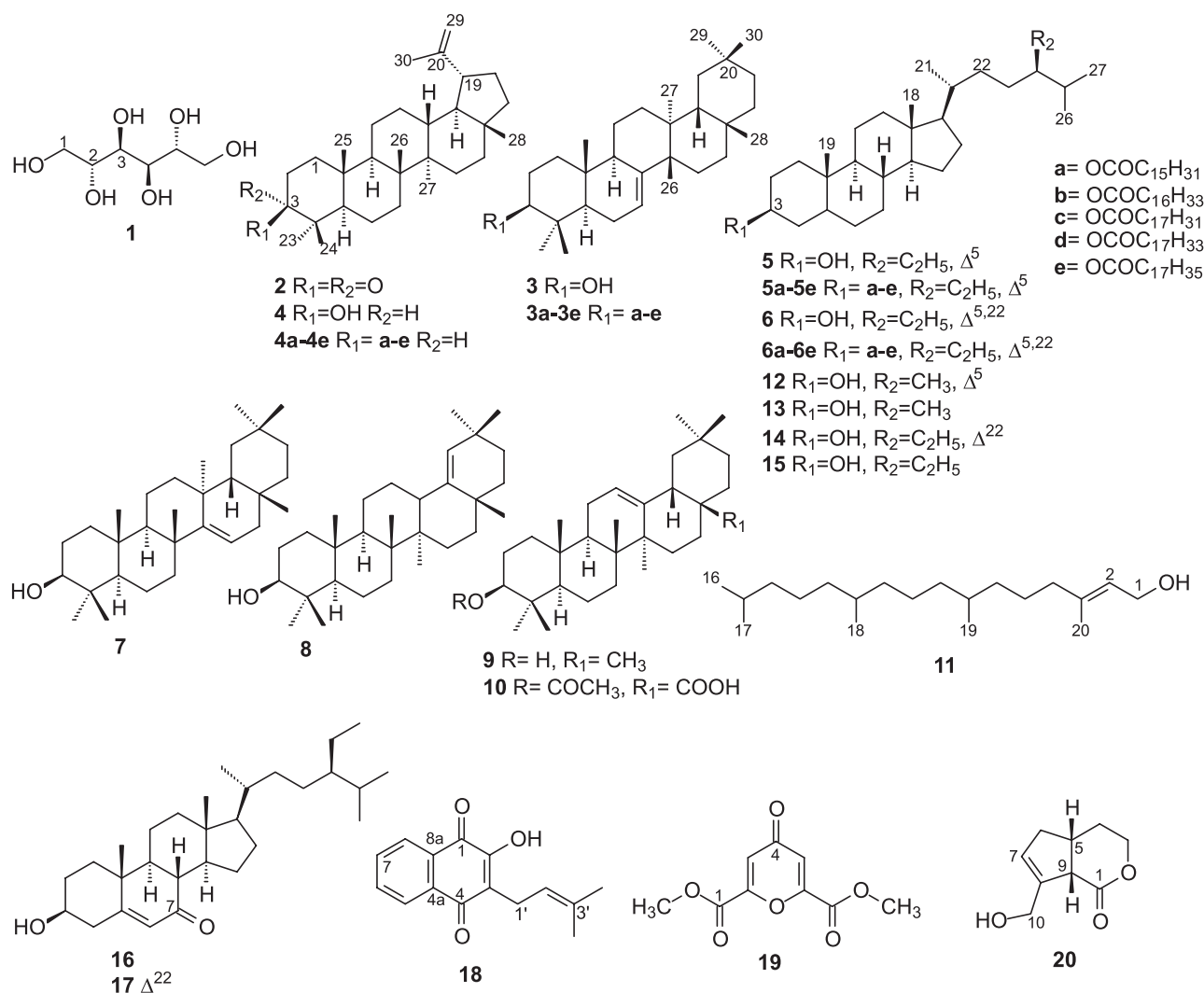


Figura 1. Constituintes químicos do caule de *T. hispida*

Tabela 1. Dados de RMN de ¹H e ¹³C do chelidonato de metila (19) (CDCl₃, 400 e 100 MHz, δ em ppm)

C	δ _C	δ _H	gHMBC
1/1'	176,8	-	H-3 (3J), H-5 (3J)
2/2'	157,5	-	H-3 (2J), H-5 (4J)
3/3'	107,6	5,85 s	-
4	187,0	-	H-3 (2J)
5/5'	56,6	3,82 s	-

anti-alérgica e foi relatado pela primeira vez de fonte natural em *Senna spectabilis* (Leguminosae).²⁵

Com exceção do D-(+)-manitol (1), β-amirina (9), sitosterol (5) e estigmasterol (6), todos os demais compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Tocoyena*. O palmitato e estearato de multiflorenila (3a e 3e), margarato, linoleato, oleato e estearato de lupeila (4b-4e), margarato, oleato e estearato de sitosterila (5b, 5d e 5e), oleato e estearato de estigmasterila (6d-6e) e chelidonato de metila (19) estão sendo relatados pela primeira vez na família Rubiaceae. O composto 20 é um 11-noriridoide, resultante da perda de C-11. Os derivados de 11-noriridoide-1,3-olídeo são raramente encontrados de fontes naturais, entretanto, foi relatado em *Morinda officinalis* (Rubiaceae).²⁶

Atividade antileishmania

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais se apresentam nas formas promastigota (extracelular) e amastigota (intracelular). Clinicamente, a leishmaniose apresenta-se nas formas cutânea e mucocutânea resultando em lesões superficiais e, na forma visceral ataca os órgãos internos podendo levar a óbito.²⁷

A ausência de vacinas e a toxicidade dos medicamentos atualmente usados para tratar a leishmaniose impulsiona a busca por novas substâncias ativas provenientes de plantas.²⁷ Dessa forma, considerando a ocorrência de atividade antileishmania em plantas da família Rubiaceae,⁶ o extrato, frações e os compostos 19 e 20 de *T. hispida* foram investigados frente a formas promastigotas de *Leishmania major*. A Tabela 2 mostra que o extrato EtOH, as frações CHCl₃, AcOEt e MeOH e os compostos 19 e 20 inibiram o crescimento de *L. major*. As frações CHCl₃ (CI₅₀=26,25 μg mL⁻¹) e AcOEt (CI₅₀=29,77 μg mL⁻¹) mostraram-se mais ativas que a fração MeOH (CI₅₀=247,34 μg mL⁻¹) e o extrato EtOH (CI₅₀=105,19 μg mL⁻¹), evidenciando que o fracionamento em coluna cromatográfica filtrante concentrou a atividade antileishmania nas frações CHCl₃ e AcOEt e que a espécie possui compostos ativos com polaridades diferentes.

A atividade antileishmania da fração CHCl₃ pode ser atribuída em parte ao chelidonato de metila (19) mas, sobretudo, a outros compostos isolados desta fração que já possuem atividade antileishmania

descrita na literatura, como o lapachol ($CI_{50}=5,2\pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$),²⁸ ácido acetiloleanólico ($CI_{50}=5,0\pm 0,1 \mu\text{M}$),²⁹ lupeol ($CI_{50}=39,06 \mu\text{g mL}^{-1}$)³⁰ e mistura de sitosterol e estigmasterol ($CI_{50}=70\pm 0 \mu\text{g mL}^{-1}$),³¹ os quais foram testados frente a *L. amazonensis*.

Tabela 2. Atividade antileishmania de *T. hispidula* frente a *L. major*

Amostras	CI_{50} em $\mu\text{g mL}^{-1}$
Extrato EtOH	105,19
Fração CHCl_3	26,25
Fração AcOEt	29,77
Fração MeOH	247,34
Chelidonato de metila (19)	163,39
Morindolídeo (20)	424,20
Anfotericina B (controle positivo)	1,74

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da fração CHCl_3 do extrato EtOH do caule de *T. hispidula* conduziu ao isolamento de seis compostos puros e quatro misturas, com predominância de triterpenoides e esteroides. Nos ensaios de atividade antileishmania frente a promastigotas de *L. major* as frações CHCl_3 e AcOEt mostraram-se mais ativas que o extrato EtOH, fração MeOH, chelidonato de metila (19) e morindolídeo (20). Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química do extrato EtOH do caule de *T. hispidula* e demonstra o potencial antileishmania da espécie.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , infravermelho (IV), cromatogramas e espectros de massas dos compostos estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Capes, ao CNPq e ao CNPq/INCTBioNat (465637/2014-0) pelo apoio financeiro e bolsas de E. A. Sousa e M. H. Chaves (302639/2015-2). Ao LAUREMN/UFPI pelos espectros de RMN e à Dra. R. R. S. Farias pela coleta e identificação do material vegetal.

REFERÊNCIAS

- Delprete, P. G.; Jardim, J. G.; *Rodriguésia* **2012**, *63*, 101.
- Barbosa, M. R.; Zappi, D.; Taylor, C.; Cabral, E.; Jardim, J. G.; Pereira, M. S.; Calió, M. F.; Pessoa, M. C. R.; Salas, R.; Souza, E. B.; Di Maio, F. R.; Macias, L.; Anunciação, E. A.; Germano Filho, P.; Oliveira, J. A.; Bruniera, C. P.; Gomes, M.; De Toni, K.; Firens, M.; 2015 *Rubiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>, acessado em novembro 2018.
- Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; Furlan, M.; Cavalheiro, A. J.; Araújo, A. R.; Silva, D. H. S.; Lopes, M. N.; *Recent Res. Dev. Phytochem.* **2001**, *5*, 19.
- Martins, D.; Nunez, C. V.; *Molecules* **2015**, *20*, 13422.
- Haudecoeur, R.; Peuchmaura, M.; Pérès, B.; Rome, M.; Taiwe, G. S.; Boumendjela, A.; Boucherle, B.; *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *212*, 106; Taika, B. B.; Bouckandou, M.; Souza, A.; Bourouboub, H. P. B.; MacKenzie, L. S.; Lione, L.; *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *216*, 203; Assi, R. A.; Darwis, Y.; Abdulbaqi, I. M.; Khan, L. V.; Vuanghao, L.; Laghari, M. H.; *Arabian J. Chem.* **2017**, *10*, 691.
- Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macêdo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M.; *Phytomedicine* **2015**, *12*, 514; Moreira, V. F.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; *Am. J. Plant Sci.* **2015**, *6*, 2612; Kato, L.; Oliveira, C. M. A.; Faria, E. O.; Ribeiro, L. C.; Carvalho, B. G.; Silva, C. C.; Schuquel, I. T. A.; Santin, S. M. O.; Nakamura, C. V.; Britta, E. A.; Miranda, N.; Iglesias, A. H.; Delprete, P. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 355; Baldé, E. S.; Megalizzi, V.; Traoré, M. S.; Cos, P.; Maes, L.; Decaestecker, C.; Pieters, L.; Baldé, A. M.; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 529; Ahua, K. M.; Ioset, J.-R.; Ioset, K. N.; Diallo, D.; Muel, J.; Hostettmann, K.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 99.
- Oliveira, J. A.; 2015. *Tocoyena* in **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14335>, acessado em novembro 2018.
- Poser, G. L. V.; Seibt, L. T.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 669.
- Bolzani, V. S.; Izumisawa, C. M.; Young, M. C. M.; Trevisan, L. M. V.; Kingston, D. G. I.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 305.
- Hamerski, L.; Carbonezi, C. A.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 601. Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Izumisawa, C. M.; Young, M. C. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 157; Santos, W. P.; Santos, H. S.; Bandeira, P. N.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Braz-Filho, R.; Albuquerque, M. R. J. R.; *Resumos da 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Florianópolis, Brasil, 2011; Rocha, M. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2009.
- Cesário, F. R. A. S.; Albuquerque, T. R.; Lacerda, G. M.; Oliveira, M. R. C.; Silva, B. A. F.; Rodrigues, L. B.; Martins, A. O. B. P. B.; Almeida, J. R. G. S.; Vale, M. L.; Coutinho, H. D. M.; Menezes, I. R. A.; *Saudi J. Biol. Sci.* (2018), doi:10.1016/j.sjbs.2018.01.008; Cesário, F. R. A. S.; Albuquerque, T. R.; Lacerda, G. M.; Oliveira, M. R. C.; Rodrigues, L. B.; Martins, A. O. B. P. B.; Boligon, A. A.; Quintans-Júnior, L. J. Q.; Araújo, A. A. S.; Vale, M. L.; Coutinho, H. D. M.; Menezes, I. R. A.; *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 321; Barros, G. S. G.; Matos, F. J. A.; Vieira, J. E. V.; Sousa, M. P.; Medeiros, M. C.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1970**, *22*, 116; Cesário, F. R. A. S.; Albuquerque, T. R.; Silva, B. A. F.; Lacerda, G. M.; Rodrigues, L. B.; Martins, A. O. B. P. B.; Quintans-Júnior, L. J.; Almeida, J. R. G. S.; Vale, M. L.; Coutinho, H. D. M.; Menezes, I. R. A.; *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *112*, 355; Ribeiro, D. S. F.; Freire, J. M. O.; Teixeira, A. H.; Val, D. R.; Freitas, A. R.; Gomes, F. I. F.; Silva, A. A. R.; Bandeira, P. N.; Santos, H. S.; Santos, W. P.; Ávila, F. N.; Pereira, K. M. A.; Goes, P.; Pinto, V. P. T.; Cristino-Filho, G.; Albuquerque, M. R. J. R.; Chaves, H. V.; Bezerra, M. M.; *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *98*, 863.
- Silva, M. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2010; Oliveira, L. S. D.; Soares, S. M. N. A.; Soares, F. A. R.; Barros, R. F. M.; *Revista Brasileira de Biociências* **2007**, *5*, 372.
- Silva, H. R.; Silva, C. C. M.; Caland-Neto, L. B.; Lopes, J. A. D.; Citó, A. M. G. L.; Chaves, M. H.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1877.
- Valadares, D. G.; Duarte, M. C.; Oliveira, J. S.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Martins, V. T.; Costa, L. E.; Leite, J. P. V.; Santoro, M. M.; Régis, W. C. B.; Tavares, C. A. P.; Coelho, E. A. F.; *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 357; Soares, D. C.; Pereira, C. G.; Meireles, M. A. A.; Saraiva, E. M.; *Parasitol. Int.* **2007**, *56*, 135.
- Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Piló-Veloso, D.; Demuner, A. J.; Howarth, O.; *Eletica Quim.* **1998**, *23*, 45.
- Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 278.
- Jo, Y.; Suh, J.; Shin, M. H.; Jung, J. H.; Im, K. S.; *Arch. Pharmacol. Res.* **2005**, *28*, 885.
- Moreira, R. Y. O.; Arruda, M. S. P.; Arruda, A. C.; Santos, L. S.; Müller, A. H.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, A. S.; Terezo, E.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 392.
- Yoshikawa, M.; Yamaguchi, S.; Nishisaka, H.; Yamahara, J.; Murakami, N.; *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1462.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.

21. De-Eknamkul, W.; Potduang, B.; *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389.
22. Rahman, A.; Ahmad, V. U. *¹³C-NMR of Natural Products: Diterpenes*. Plenum Press: New York, 1992.
23. Wang, Q.-Y.; Cui, G.-X.; Wu, J.-C.; Chen, Y.-G.; *Chem. Nat. Compd.* **2015**, *51*, 1196; Li, R.-J.; Guo, D.-X.; Lou, H.-X.; *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 74.
24. Shen, Z.-W.; Fisinger, U.; Poulev, A.; Eisenreich, W.; Werner, I.; Pleiner, E.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 33.
25. Mallaiah, B. V.; Kumar, K. A.; Sarma, P. N.; Srimannarayana, G.; *Curr. Sci.* **1984**, *53*, 33.
26. Ban, N. K.; Giang, V. H.; Linh, T. M.; Lien, L. Q.; Ngoc, N. T.; Thao, D. T.; Nam, N. H.; Cuong, N. X.; Kiem, P. V.; Minh, C. V.; *Phytochem. Lett.* **2013**, *6*, 267.
27. Cock, I. E.; Selesho, M. I.; Vuuren, S. F. V.; *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *220*, 250.
28. Lima, N. M. F.; Correia, C. S.; Leon, L. L.; Machado, G. M. C.; Madeira, M. F.; Santana, A. E. G.; Goulart, M. O. F.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2004**, *99*, 757.
29. Gnoatto, S. C. B.; Vechia, L. D.; Lencina, C. L.; Dassonville-Klimpt, A.; Nascimento, S.; Mossalayi, D.; Guillon, J.; Gosmann, G.; Sonnet, P.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 604.
30. Souza, A. C.; Alves, M. M. M.; Brito, L. M.; Oliveira, L. G. C.; Sobrinho-Júnior, E. P. C.; Costa, I. C. G.; Freitas, S. D. L.; Rodrigues, K. A. F.; Chaves, M. H.; Arcanjo, D. D. R.; Carvalho, F. A. A.; *J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1.
31. Silva, A. A. S.; Morais, S. M.; Falcão, M. J. C.; Vieira, I. G. P.; Ribeiro, L. M.; Viana, S. M.; Teixeira, M. J.; Barreto, F. S.; Carvalho, C. A.; Cardoso, R. P. A.; Andrade-Junior, H. F.; *Phytotherapy* **2014**, *21*, 1419.